

***P*rotéines G trimériques et transport vésiculaire : implication d'une protéine Go granulaire dans une étape de l'exocytose contrôlée**

Les cellules neuroendocrines et les neurones stockent leurs produits de sécrétion dans des vésicules membranaires spécialisées de type vésicules synaptiques pour les neurotransmetteurs ou granules de sécrétion à cœur dense (LDCV pour *large dense core vesicles*), pour les neurohormones et neuropeptides. La libération des produits intravésiculaires ou intragranulaires se fait par exocytose, mécanisme impliquant un mouvement de la vésicule ou du granule vers la membrane plasmique suivi d'une fusion entre membranes vésiculaire/granulaire et plasmique qui permet la libération des produits de sécrétion dans l'espace extracellulaire. Diverses approches méthodologiques permettant d'évaluer les cinétiques d'exocytose suggèrent des différences fondamentales entre la sécrétion des neurotransmetteurs à partir des vésicules synaptiques et la sécrétion des neuropeptides à partir des granules de sécrétion [1]. Ainsi la libération des neurotransmetteurs est un phénomène extrêmement rapide qui a lieu dans la milliseconde qui suit la stimulation cellulaire, ce qui laisse penser que la vésicule synaptique est prépositionnée au niveau des sites d'exocytose dans les cellules au repos. En revanche, un délai de l'ordre de cent millisecondes existe entre la stimulation et la libération du contenu des granules de sécrétion. L'identification récente d'un certain nombre de protéines associées aux vésicules synaptiques a permis une avancée rapide et inattendue des connaissances dans le domaine de la libération synaptique, et semble confirmer l'arrimage des vésicules à la membrane plasmique

[2, 3]. En revanche, les mécanismes permettant la sécrétion des granules neuroendocrines et des LDCV neuroaux restent à l'heure actuelle largement méconnus.

Les deux étapes de l'exocytose du granule de sécrétion

La cellule chromaffine de la médullosurrénale est un modèle expérimental illustrant parfaitement la richesse et la complexité des mécanismes moléculaires qui contrôlent et régissent la libération du granule de sécrétion. Les techniques de perméabilisation sélective de la membrane plasmique, qui constituent une approche efficace des mécanismes moléculaires intracellulaires, ont permis d'observer que l'exocytose des granules de sécrétion est un mécanisme qui se découpe en deux étapes successives: une étape dite de préparation des granules qui requiert de l'ATP et des concentrations micromolaires de calcium, suivie d'une étape de fusion proprement dite qui ne nécessite pas d'ATP mais des quantités relativement plus importantes de calcium sous la membrane plasmique. L'introduction d'analogues non hydrolysables du GTP dans le cytoplasme des cellules chromaffines perméabilisées montre sans ambiguïté la participation directe de protéines dont l'activité est modulée par le GTP (protéines G) à ces deux étapes de l'exocytose [4]. Sachant que ces analogues modulent aussi bien l'activité des protéines G hétérotrimériques que des protéines G monomériques de type Ras, nous avons cherché à connaître la nature des protéines G impliquées dans

l'exocytose en utilisant des outils ciblant spécifiquement les protéines G de type trimérique [5].

Le mastoparan est un peptide amphiphile du venin de guêpe capable de pénétrer les bicouches lipidiques et d'y adopter une conformation structurale qui ressemble au fragment intracellulaire des récepteurs couplés aux protéines G trimériques. Le mastoparan peut ainsi activer directement les protéines G situées sur la face cytosolique de la membrane plasmique sans qu'une perméabilisation membranaire soit nécessaire. Nos résultats indiquent que le mastoparan est capable de bloquer l'étape de l'exocytose dépendante de l'ATP dans les cellules chromaffines en culture, mais à condition d'être introduit directement dans le cytoplasme par une perméabilisation de la membrane plasmique [6]. Cette observation suggère que la cible du mastoparan dans l'exocytose n'est pas une protéine G associée à la membrane plasmique mais pourrait être une des protéines G trimériques que nous avons identifiées au niveau de la membrane des granules de sécrétion [7]. Des mesures directes de liaison et d'hydrolyse du GTP au niveau de la membrane des granules chromaffines confirment la capacité du mastoparan de stimuler l'activité des protéines G trimériques associées aux granules de sécrétion [6]. L'utilisation de peptides capables d'empêcher les interactions mastoparan/protéine G et d'anticorps spécifiques dirigés contre le domaine C-terminal de G α_o , G $\alpha_{i1/2}$ et G α_{i3} nous permet de dire que la protéine G activée par le mastoparan au niveau des granules de sécrétion est de type Go. De plus,

l'effet inhibiteur qu'exerce le mastoparan sur l'étape de l'exocytose dépendante de l'ATP peut être sélectivement bloqué par l'anticorps anti-G α_o ou par un peptide correspondant à l'extrémité C-terminale de G α_o . L'ensemble de ces données suggère qu'une protéine de type Go localisée au niveau des granules chromaffines bloque l'exocytose lorsqu'elle est activée de manière irréversible par le mastoparan ou par des analogues non hydrolysables du GTP.

Le mastoparan est également capable de modifier l'étape terminale de l'exocytose indépendante de l'ATP. Cet effet stimulateur du mastoparan requiert la présence de calcium mais ne peut être observé qu'en épuisant l'ATP cytosolique par une perméabilisation de la membrane plasmique permettant une dialyse du cytoplasme [8]. Par ailleurs, l'effet activateur du mastoparan est bloqué par la toxine pertussique et par les anticorps anti-G α_i . L'étape terminale de l'exocytose indépendante de l'ATP est donc bien, elle aussi, sous le contrôle d'une protéine G trimérique. Il pourrait s'agir d'une protéine de type G i_3 localisée au niveau de la membrane plasmique. En effet le mastoparan stimule les protéines G de la membrane plasmique et l'exocytose avec une sensibilité aux ions Mg $^{2+}$ équivalente et ces effets peuvent être bloqués spécifiquement par l'anticorps anti-G α_i et par le peptide synthétique correspondant à l'extrémité C-terminale de G α_i . Par ailleurs, une étude immunocytochimique détaillée de la distribution intracellulaire des différentes familles de protéines G trimériques présentes dans les cellules chromaffines, étude réalisée sur des fractions subcellulaires et sur des cellules en culture par microscopie confocale, indique une localisation préférentielle de G i_3 sur la membrane plasmique alors que Go se trouve sur la membrane plasmique et sur la membrane des granules de sécrétion.

Le contrôle de l'exocytose

Un neurone ou une cellule neuroendocrine non stimulés doivent pouvoir retenir leurs vésicules synaptiques et granules de sécrétion tout en assurant le transport et l'exocytose

des vésicules constitutives. Ainsi, dans une cellule au repos, les granules de sécrétion pourraient être immobilisés par un mécanisme qui serait inhibé lors de l'augmentation cytosolique de calcium accompagnant l'activation cellulaire. Nous proposons que ce mécanisme de contrôle implique une protéine trimérique Go associée à la membrane des granules de sécrétion. On peut imaginer que l'activité de Go consisterait à empêcher le mouvement des granules vers les sites d'exocytose et/ou à empêcher la liaison à la surface des granules d'un complexe requis pour la fusion avec la membrane plasmique. Lorsqu'une cellule est stimulée et que la concentration de calcium s'élève dans le cytoplas-

me, il y aurait inactivation de Go par un mécanisme qui demande à être précisé. L'étape de l'exocytose dépendante de l'ATP pourrait alors s'enclencher, suivie de l'étape terminale - indépendante de l'ATP - de fusion avec la membrane plasmique. Cette dernière étape requiert des concentrations importantes de calcium et pourrait nécessiter l'activation d'une deuxième protéine G trimérique de type G i_3 localisée au niveau de la membrane plasmique. Nos résultats semblent indiquer que le mastoparan stimule cette étape terminale de l'exocytose en activant une protéine de type phospholipase A2 [8]. La production de lysophospholipides et d'acide arachidonique pourrait avoir un rôle fondamental

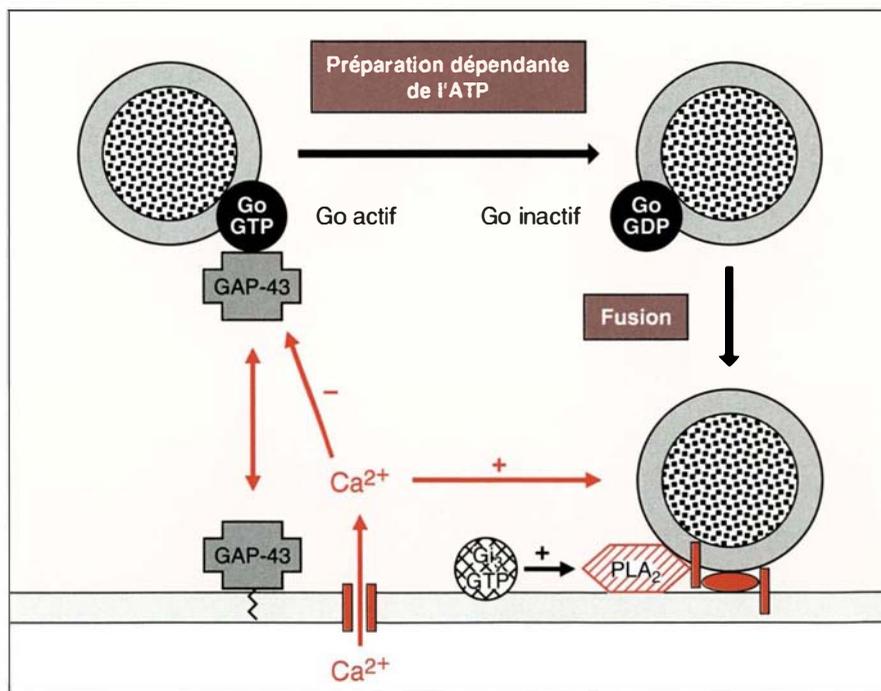


Figure 1. Modèle décrivant la fonction possible des protéines G trimériques Go et Gi₃ dans le mécanisme de l'exocytose contrôlée. L'exocytose contrôlée des granules de sécrétion comporte une étape de préparation qui requiert de l'ATP et du calcium, et une étape de fusion qui ne nécessite que du calcium. La fonction de la protéine Go granulaire serait d'empêcher l'entrée des granules dans ce processus d'exocytose lorsque la cellule n'est pas stimulée. La forme cytosolique de la GAP-43 permettrait le maintien de Go sous sa forme active dans la cellule au repos. Le calcium entrant dans la cellule à la suite d'une stimulation inhiberait l'interaction GAP-43/Go et, ce faisant, permettrait l'étape de fusion entre granule et membrane plasmique. Cette étape de fusion pourrait impliquer une protéine Gi₃ qui, en contrôlant une activité de type phospholipase A2 (PLA₂), favoriserait la déstabilisation membranaire.

dans le processus de déstabilisation membranaire permettant la création d'un point de fusion entre les membranes granulaire et plasmique et la libération du contenu granulaire dans le milieu extracellulaire.

L'existence d'une protéine G hétérotrimérique de type Go associée à la membrane des granules de sécrétion et contrôlant la sécrétion par exocytose pose un certain nombre de questions concernant, en particulier, les modalités de son activation et/ou inactivation. Les protéines G trimériques ont été décrites à l'origine comme étant des molécules permettant la transduction du signal entre un récepteur de la membrane plasmique et un effecteur intracellulaire. La mise en évidence récente de ces protéines au niveau de divers compartiments intracellulaires suggère cependant un rôle plus étendu, hypothèse qui semble actuellement confirmée par les fonctions que semblent assurer ces protéines dans différentes étapes du circuit vésiculaire [9]. La question essentielle de leur mécanisme d'activation reste cependant posée dans la mesure où un contrôle direct par un récepteur de la membrane plasmique n'est pas concevable. Ainsi, l'implication d'une protéine Go granulaire dans le contrôle de l'exocytose suppose qu'une protéine intracellulaire pourrait jouer en quelque sorte le rôle de pseudorécepteur et contrôler l'activité de Go en fonction de l'état d'activation de la cellule. Cette protéine hypothétique devrait être directement ou indirectement sensible aux variations cytosoliques de calcium qui accompagnent l'activation cellulaire. La GAP (*growth-associated protein*)-43 est à ce jour la seule protéine cytosolique connue, capable de stimuler l'échange GDP/GTP d'une protéine G trimérique: cette propriété a été observée *in vitro* avec les protéines G α o et GAP-43 purifiées [10]. La GAP-43 est une protéine que l'on trouve en forte concentration dans les cônes de croissance neuronaux et dans les terminaisons présynaptiques; sa présence dans certaines cellules neuroendocrines a été décrite récemment. Son rôle reste incertain malgré son implication dans un certain nombre de fonctions cellu-

lares telles que la croissance axonale et la neurosécrétion. C'est une protéine sensible au calcium dans la mesure où elle possède un site de liaison pour la calmoduline et un site de phosphorylation par la protéine kinase C. Nous avons purifié la GAP-43 de la médullosurrénale et montré que la forme cytosolique de la protéine est capable d'inhiber l'étape de l'exocytose dépendante de l'ATP dans les cellules chromaffines perméabilisées. En outre, de manière similaire au mastoparan, la GAP-43 peut stimuler les protéines G trimériques présentes à la surface des granules chromaffines. Afin de vérifier que la GAP-43 est bien un pseudorécepteur potentiel pour la protéine Go granulaire, nous avons recherché la cible éventuelle de la GAP-43 dans les cellules chromaffines perméabilisées. Ces expériences ont été réalisées à l'aide d'anticorps monospécifiques préparés contre les différentes familles de protéines G trimériques présentes dans les cellules chromaffines. Seuls les anticorps anti-G α o sont capables de lever l'inhibition de la sécrétion produite par l'introduction de GAP-43 dans le cytoplasme des cellules chromaffines [11]. De plus, la micro-injection d'un peptide N-terminal de la GAP-43 correspondant au domaine d'interaction avec Go, bloque partiellement l'activité sécrétrice des cellules chromaffines, en accord avec l'implication possible de cette protéine dans le contrôle de l'exocytose. Ainsi la GAP-43 pourrait participer aux événements de l'exocytose en maintenant l'activité de Go dans les cellules au repos et, ce faisant, en empêchant le déclenchement non contrôlé de l'événement exocytotique. Cette hypothèse implique un découplage de la relation GAP-43/Go lors de la stimulation cellulaire, découplage qui pourrait être induit par un mécanisme sensible au calcium. La GAP-43 *per se* n'étant présente que dans certains types de cellules neuroendocrines, elle est peut-être le premier maillon identifié d'une famille de protéines dont la fonction serait de coupler l'activité d'une protéine G trimérique localisée sur un compartiment intracellulaire à un état physiologique particulier d'une cellule ■

RÉFÉRENCES

1. Chow RH, von Ruden L, Neher E. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 1992; 356: 60-3.
2. Sudhof TC, Jahn R. Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron* 1991; 6: 665-77.
3. Sudhof TC, De Camilli P, Niemann H, Jahn R. Membrane fusion machinery: insights from synaptic proteins. *Cell* 1993; 75: 1-4.
4. Sontag JM, Aunis D, Bader MF. Two GTP-binding proteins control calcium-dependent exocytosis in chromaffin cells. *Eur J Neurosci* 1992; 4: 98-101.
5. Bockaert J. Les récepteurs à sept domaines transmembranaires: physiologie et pathologie de la transduction. *médecine/sciences* 1995; 11: 382-94.
6. Vitale N, Mukai H, Rouot B, Thiersé D, Aunis D, Bader MF. Exocytosis in chromaffin cells. Possible involvement of the heterotrimeric GTP-binding protein Go. *J Biol Chem* 1993; 268: 14715-23.
7. Toutant M, Aunis D, Bockaert J, Homburger V, Rouot B. Presence of three pertussis toxin substrates and G α immunoreactivity in both plasma and granule membranes of chromaffin cells. *FEBS Lett* 1987; 215: 339-44.
8. Vitale N, Thiersé D, Aunis D, Bader MF. Exocytosis in chromaffin cells: evidence for a MgATP-independent step that requires a pertussis toxin-sensitive GTP-binding protein. *Biochem J* 1994; 300: 217-27.
9. Barr FA, Leyte A, Huttner WB. Trimeric G proteins and vesicle formation. *Trends Cell Biol* 1992; 2: 91-4.
10. Strittmatter SM, Valenzuela D, Kennedy TE, Neer EJ, Fishman MC. Go is a major growth cone protein subject to regulation by GAP-43. *Nature* 1990; 344: 836-41.
11. Vitale N, Deloulme JC, Thiersé D, Aunis D, Bader MF. GAP-43 controls the availability of secretory chromaffin granules for regulated exocytosis by stimulating a granule-associated Go. *J Biol Chem* 1994; 269: 30293-8.

Nicolas Vitale
Dominique Aunis
Marie-France Bader

Inserm U. 338, biologie de la communication cellulaire, 5, rue Blaise-Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France.

TIRÉS À PART

N. Vit le.